

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-040046

(43)Date of publication of application : 13.02.2001

(51)Int.Cl.

C08F220/58
C07H 15/04
C08B 37/00
C08F212/00
C08F218/00
C08F220/06
C08F220/10
C08F220/54
C08F290/02
C08F291/00
C12N 9/10
C12N 11/08

(21)Application number : 2000-153460

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 24.05.2000

(72)Inventor : NISHIGUCHI SUSUMU

SHIBATANI SHIGEO

TODA ATSUSHI

NISHIMURA SHINICHIRO

NAKAO AYAKO

YAMADA KURIKO

(30)Priority

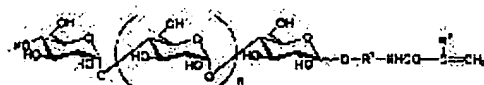
Priority number : 11146671 Priority date : 26.05.1999 Priority country : JP

(54) ACRYLAMIDE DERIVATIVE HAVING MALTOOLIGOSACCHARIDE CHAIN AS SIDE CHAIN AND IMMOBILIZED ENZYME UTILIZING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new compound having maltooligosaccharide chain as side chain and useful as raw material for immobilized enzyme.

SOLUTION: This new compound is expressed by the formula [wherein R1 is a 2-20C alkylene; R2 is H or methyl; and (n) is 1 to 5] and is e.g. 3-



acryloylaminopropyl- β -maltotrioside. The compound of the formula is obtained e.g. by treating maltooligosaccharide with acetic anhydride and hydrogen bromide/acetic acid to protect hydroxyl group with acetyl group and simultaneously to brominate the 1-position, followed by reacting the reaction product with an N-protected amino alkanol in the presence of an adequate catalyst, by eliminating the N-protected group, by converting the reaction product into an acryloyl compound and by deacetylation. A copolymer obtained by copolymerizing the compound of the formula with a vinyl-based monomer (e.g. acrylamide, methyl methacrylate, etc.), is combined with a fusion protein of maltose-binding protein with enzyme to obtain immobilized enzyme. A copolymerization ratio of the compound of the formula to the vinyl-based monomer preferably is 1:(10 to 1,000,000).

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-40046
(P2001-40046A)

(43)公開日 平成13年2月13日(2001.2.13)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト [*] (参考)
C 0 8 F 220/58		C 0 8 F 220/58	
C 0 7 H 15/04		C 0 7 H 15/04	E
C 0 8 B 37/00		C 0 8 B 37/00	K
C 0 8 F 212/00		C 0 8 F 212/00	
218/00		218/00	
審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 9 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000-153460(P2000-153460)	(71)出願人	000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成12年5月24日(2000.5.24)	(72)発明者	西口 進 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
(31)優先権主張番号	特願平11-146671	(72)発明者	柴谷 滋郎 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡 績株式会社総合研究所内
(32)優先日	平成11年5月26日(1999.5.26)	(72)発明者	戸田 篤志 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株 式会社敦賀バイオ研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 マルトオリゴ糖鎖を側鎖に有するアクリルアミド誘導体およびそれを利用した固定化酵素

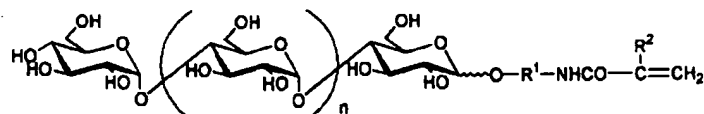
(57)【要約】

【課題】 マルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質を利用し、容易に、効率よく、しかも酵素脱離の起こりにくい固定化酵素の調製方法を提供する。

【解決手段】 一般式(1)(式中、R¹は炭素数が2～20のアルキレン基を示し、R²はHまたはメチル基

を示し、nは1～5の整数を示す)で示されるアクリルアミド誘導体、該アクリルアミド誘導体およびビニル系単量体とを含む共重合体、ならびにこれらを用いた固定化酵素。

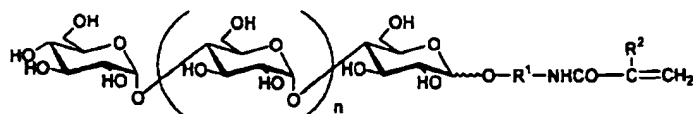
【化1】



(1)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)



(式中、R¹は炭素数が2～20のアルキレン基を示し、R²はHまたはメチル基を示し、nは1～5の整数を示す)で示されることを特徴とするアクリルアミド誘導体。

【請求項2】 前記一般式(1)で示される少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含むことを特徴とする共重合体。

【請求項3】 前記一般式(1)で示される少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含むことを特徴とするグラフト共重合体。

【請求項4】 架橋剤として少なくとも1種類の分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体を含む請求項2または3に記載の共重合体。

【請求項5】 ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる請求項2～4に記載の共重合体。

【請求項6】 架橋剤がN, N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる請求項4または5に記載の共重合体。

【請求項7】 前記一般式(1)で示される少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合比が1:10～100000である請求項2～6のいずれかに記載の共重合体。

【請求項8】 架橋剤の割合が0.1～20%である請求項4～7のいずれかに記載の共重合体。

【請求項9】 請求項2～8のいずれかに記載の共重合体にマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合されたことを特徴とする固定化酵素。

【請求項10】 少なくとも1種類の請求項1に記載のアクリルアミド誘導体とマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合された複合体と少なくとも1種類のビニル系単量体を共重合されてなることを特徴とする固定化酵素。

【請求項11】 前記複合体と少なくとも1種類のビニル系単量体を架橋剤存在下共重合させることにより得られる請求項10記載の固定化酵素。

【請求項12】 ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン

【化1】

(1)

類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる請求項10または11に記載の固定化酵素。

【請求項13】 架橋剤がN, N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる請求項11または12に記載の固定化酵素。

【請求項14】 前記複合体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合比が1:100～100000である請求項10～13のいずれかに記載の固定化酵素。

【請求項15】 架橋剤の割合が0.1～20%である請求項11～14のいずれかに記載の固定化酵素。

【請求項16】 酵素が糖転移酵素である請求項9～15のいずれかに記載の固定化酵素。

【請求項17】 糖転移酵素がβ1, 4-ガラクトース転移酵素である請求項16記載の固定化酵素。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規なアクリルアミド誘導体およびその重合体に関する。また、本発明は該アクリルアミド誘導体あるいはその重合体を利用した固定化酵素に関する。

【0002】

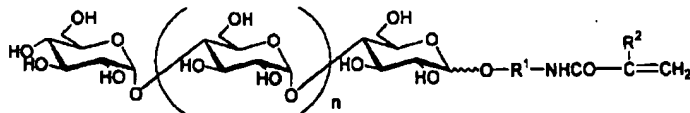
【従来の技術】これまで、酵素の固定化方法として種々の方法が開発されてきたが、大きく分けて4つの方法に分類される。すなわち、(1)共有結合による固定化、(2)イオン結合による固定化、(3)物理的吸着による固定化、(4)物理的封じ込め(包括)による固定化である。しかしながら、いずれの方法にも一長一短があり、(1)の方法では酵素は担体に強固に結合されるため、一旦固定化された酵素が脱離してくることはないが、固定化時に酵素の失活の程度が大きい。(2)あるいは(3)の方法では固定化時の酵素の失活は少ないが、担体と酵素との結合があまり強固でないため、一旦固定化された酵素が脱離してくることがある。(4)の方法は酵素を高分子の格子の中に単に物理的に封じ込めるだけであり、固定化された酵素は容易に脱離してくる。

【0003】

一方、近年遺伝子組換え技術が進歩し、種々の酵素が大腸菌をはじめとする細菌類で生産されるようになり、固定化する酵素も組換え酵素が中心になってきた。また、ヒトなどの高等動物由来の酵素を発見させようとしたとき、発現蛋白質が不溶性のインクルージョンボディを形成し、酵素活性を発現できないことがしば

しばあり、このようなときの有効な解決手段として、目的とする酵素を他の蛋白質、例えばマルトース結合性蛋白質（以下、MBPとも示す）、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの融合蛋白質として発現させるという方法が用いられる。例えば、MBPとの融合蛋白質として発現させる方法は特許第2703770号公報に開示されている。その中で、可溶性蛋白質として発現できる他に、MBPのマルトース結合性を利用して、融合蛋白質を効率よく精製できるという利点があり、また、このマルトース結合性を利用して容易に固定化酵素を調製することができるという利点もあることが開示されている。具体的に固定化担体として架橋アミロースが用いられており、アミロースレジンという商品名で市販されているが、架橋アミロースとMBPの結合は必ずしも強いものではなく、場合によっては酵素が結合できなかったり、一旦結合した酵素が脱離したりするという欠点がある。これは、MBPの基質特異性に起因しており、より親和性の高い担体を用いることにより克服できる。

【0004】マルトオリゴ糖鎖を側鎖に有する高分子としては、エピクロロヒドリンを用いてアガロースなどにマルトオリゴ糖を結合させたものがあるが、マルトオリゴ糖鎖の密度をコントロールできないため、オリゴ糖鎖がMBPと酵素の融合蛋白質との結合に必ずしも有効に利用されているとはいえない。この他には、マルトオリゴ糖と分子内にアミノ基と重合性ビニル基を有する化合物とを還元アミノ化により結合させ、重合性ビニル基を重合させることによりマルトオリゴ糖鎖を側鎖にもつ高分子を得る方法がある。しかし、この方法ではオリゴ糖鎖の還元末端にある糖が開環してしまうため、貴重な糖鎖の糖残基が1つ減ってしまうという欠点がある。また、還元アミノ化ではシアノ水素化ホウ素ナトリウムのような有毒な物質を用いるため危険であるという欠点もある。



【0010】(2) 前記一般式 (I) で示される少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含むことを特徴とする共重合体

(3) 前記一般式 (I) で示される少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体および少なくとも1種類のビニル系単量体とを含むことを特徴とするグラフト共重合体。

(4) 架橋剤として少なくとも1種類の分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体を含む(2)または(3)の共重合体。

(5) ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリル

【0005】酵素と重合性単量体とを結合させた後重合し、固定化酵素を得るという方法としては、共有結合により酵素と重合性単量体を結合させてから重合し調製したという報告はあるが、MBPとマルトオリゴ糖鎖の間に存在するようなアフィニティを利用して酵素と重合性単量体との複合体を調製し、得られた複合体を重合し調製したという報告は見当たらない。また、この方法は重合性単量体と酵素とを共有結合で結合させているため、共有結合形成の際に酵素が失活してしまう可能性がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、マルトース結合性蛋白質と酵素との融合蛋白質を利用し、容易に、効率よく、しかも酵素脱離の起こりにくい固定化酵素の調製方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題を解決するために鋭意検討した結果、新規なマルトオリゴ糖鎖を側鎖に有するアクリルアミド誘導体を合成し、これと少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合あるいはグラフト共重合し、マルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質を接触させること、あるいは上記アクリルアミド誘導体と上記融合蛋白質とを接触させ複合体を形成させた後、該複合体と少なくとも1種類のビニル系単量体とを共重合させることにより、上記問題点を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

(1) 一般式 (I) (式中、 R^1 は炭素数が2~20のアルキレン基を示し、 R^2 はHまたはメチル基を示し、 n は1~5の整数を示す) で示されることを特徴とするアクリルアミド誘導体。

【0009】

【化2】

(1) アミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる(2)~

(4)のいずれかの共重合体。

(6) 架橋剤がN, N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる

(4)または(5)の共重合体。

(7) 前記一般式 (I) で示される少なくとも1種類のアクリルアミド誘導体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合比が1:10~100000である(2)

～(6)のいずれかの共重合体。

(8) 架橋剤の割合が0.1～20%である(4)～(7)のいずれかの共重合体。

(9) (2)～(8)のいずれかの共重合体にマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合されたことを特徴とする固定化酵素。

(10) 少なくとも1種類の請求項1に記載のアクリルアミド誘導体とマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質が結合された複合体と少なくとも1種類のビニル系単量体を共重合されてなることを特徴とする固定化酵素。

(11) 前記複合体と少なくとも1種類のビニル系単量体を架橋剤存在下共重合させることにより得られる(10)の固定化酵素。

(12) ビニル系単量体がアクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類からなる群より選ばれる(10)または(11)の固定化酵素。

(13) 架橋剤がN, N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンからなる群より選ばれる(11)または(12)の固定化酵素。

(14) 前記複合体と少なくとも1種類のビニル系単量体の共重合比が1:100～100000である(10)～(13)のいずれかの固定化酵素。

(15) 架橋剤の割合が0.1～20%である(11)～(14)のいずれかの固定化酵素。

(16) 酵素が糖転移酵素である(9)～(15)のいずれかの固定化酵素。

(17) 糖転移酵素が β 1, 4-ガラクトース転移酵素である(16)の固定化酵素。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態を挙げて詳細に説明する。本発明のアクリルアミド誘導体は上記一般式(1)で示される。式中、 R^1 は炭素数が2～20のアルキレン基を示し、 R^2 はHまたはメチル基を示し、nは1～5の整数を示す。 R^1 の炭素数が2～20のアルキレン基としては、プロピレン基、ヘキシレン基、オクチレン基、ドデシレン基、オクタデシレン基などが挙げられる。

【0012】本発明においてアクリルアミド誘導体としては、 R^1 、 R^2 およびnは任意に組み合わせることができる。また、本発明のアクリルアミド誘導体は通常用いられている各種有機合成化学的手法により合成することができる。例えば、マルトオリゴ糖を無水酢酸と臭化水素/酢酸で処理し、水酸基をアセチル基で保護すると同時に1位をブロム化する。その後、適当な触媒存在下、N-保護アミノアルコールと反応させる。次いで、N-保護基を脱離した後、アクリロイル化、脱アセチル化

することにより、目的のアクリルアミド誘導体を得ることができる。また、マルトオリゴ糖を臭化ベンジルを用いて、水酸基をベンジル化した後、1位のベンジル基を脱保護した後、トリクロロアセトニトリルで処理し、1位をトリクロロアセトイミデート化する。その後、上記と同様N-保護アミノアルコールとの縮合反応、N-保護基の脱保護、脱ベンジル化、アクリロイル化を行うことによっても、目的のアクリルアミド誘導体を得ることができる。

【0013】本発明に利用できるビニル系単量体としては、一般式(1)で示されるアクリルアミド誘導体と共重合できるものであれば特に制限はされないが、アクリルアミド類、メタクリルアミド類、アクリル酸、メタクリル酸、アクリル酸エステル類、メタクリル酸エステル類、スチレン類、脂肪酸ビニルエステル類が好ましい。アクリルアミド類としてはアクリルアミドやN-メチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミドなどのN-アルキルアクリルアミド類を挙げることができる。メタクリルアミド類としてはメタクリルアミド、N-メチルメタクリルアミドやN-イソプロピルメタクリルアミドなどのN-アルキルメタクリルアミド類を挙げることができる。アクリル酸エステル類としてはアクリル酸メチル、アクリル酸エチル、アクリル酸ヒドロキシエチル、アクリル酸ジメチルアミノエチルなどを挙げることができる。メタクリル酸エステル類としてはメタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸ヒドロキシエチル、メタクリル酸ジメチルアミノエチルなどが挙げられる。スチレン類としてはスチレン、p-ヒドロキシスチレンなどが挙げられる。脂肪酸ビニルエステル類としては酢酸ビニル、酪酸ビニルなどが挙げられる。

【0014】本発明の一般式(1)で示されるアクリルアミド誘導体とビニル系単量体からなる共重合体は一般式(1)で示されるアクリルアミド誘導体と上記ビニル系単量体とをラジカル重合、アニオン重合、カチオン重合などの手法により共重合させることにより合成することができ、通常ペルオキシ二硫酸アンモニウムなどを触媒とするラジカル重合で合成する。また、一般式(1)で示されるアクリルアミド誘導体とビニル系単量体からなる共重合体をグラフトさせることのできる高分子は、該共重合体をグラフトさせることのできる高分子であれば特に制限はなく、例えば分子中にアミノ基、水酸基、チオール基、トシル基、ヨードなどを有する高分子が挙げられる。さらに、共重合させるとき架橋剤を共存させてもかまわない。利用できる架橋剤としては、分子内に重合性ビニル基を2個以上有するビニル系単量体であれば特に制限はなく、例えば、N, N'-メチレンビスアクリルアミド、メタクリル酸ビニル、ジメタクリル酸エチレングリコール、ジビニルベンゼンなどが開示される。一般式(1)で示されるアクリルアミド誘導体とビ

ニル系単量体の共重合比は1:5~1000000が好ましく、特に1:10~1000000が好ましい。また、架橋剤を用いるときは、上記アクリルアミド誘導体と上記ビニル系単量体の合計量に対してその割合が、0.05~30%が好ましく、0.1~20%が特に好ましい。

【0015】また、共重合体を合成するときには、一般式(I)で示されるアクリルアミド誘導体のうち少なくとも1種類と上記ビニル系単量体のうち少なくとも1種類を任意に組み合わせて用いることができる。

【0016】本発明の固定化酵素に用いることのできるマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質は、マルトース結合性を有しているマルトース結合蛋白質と酵素との融合蛋白質であれば、特に制限はなく、一般的には遺伝子組換え手法を利用して得ることができる。また、酵素は目的とする酵素活性を有していれば必ずしも酵素蛋白質全体である必要はなく、その断片であっても構わない。利用できる酵素としては特に制限はないが、糖転移酵素が好ましい。糖転移酵素としては、ガラクトース転移酵素、N-アセチルグルコサミン転移酵素、フコース転移酵素、シアル酸転移酵素、マンノース転移酵素、N-アセチルガラクトサミン転移酵素、キシロース転移酵素、グルクロン酸転移酵素などが挙げられる。

【0017】本発明の固定化酵素は、例えば上記共重合体あるいは上記グラフト共重合体と上記融合蛋白質とを適当な溶液中で接触させることにより調製することができる。用いることのできる溶液としては、融合蛋白質の酵素活性が失活しないものであれば特に制限はないが、通常pH7付近の緩衝液が用いられる。必要に応じて、融合蛋白質を安定化させるような添加剤、例えば、2-メルカプトエタノールなどのような還元剤やカルシウム、マグネシウム、マンガンなどの金属塩を添加しても構わない。共重合体あるいはグラフト共重合と融合蛋白質とは上記緩衝液中で、通常0~40℃で5分~24時間接触させる。このとき穏やかに振とうさせてもよい。

【0018】また、本発明の固定化酵素は、上記アクリルアミド誘導体と上記融合蛋白質とを適当な溶液中で接触させ、複合体を形成させた後、少なくとも1種の上記ビニル系単量体を加え、架橋剤存在下あるいは非存在下で共重合させることによって調製することができる。アクリルアミド誘導体とビニル系単量体の共重合比は1:10~1000000が好ましく、1:100~1000000が特に好ましい。また、架橋剤を用いるときは、上記アクリルアミド誘導体と上記ビニル系単量体の合計量に対してその割合が、0.05~30%が好ましく、0.1~20%が特に好ましい。

【0019】

【実施例】以下に、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はかかる実施例により限定されるも

のではない。

【0020】参考例1 デカアセチルマルトトリオシルブロミドの合成

マルトトリオース10gをナスフラスコにとり、無水酢酸55mlと30%臭化水素/酢酸15mlに室温で3時間攪拌しながら溶解した。さらに30%臭化水素/酢酸75mlを加え、室温で4時間攪拌した後、反応溶液を減圧下で濃縮した。さらに、トルエン、クロロホルムで共沸させながら減圧濃縮した。油状の粗デカアセチルマルトトリオシルブロミド19.4gを得た。

【0021】参考例2 3-(N-ベンジルオキシカルボニル)アミノプロピル-β-マルトトリオシドデカアセテートの合成

参考例1で得た粗デカアセチルマルトトリオシルブロミド19.4gをナスフラスコにとり、1,2-ジクロロエタン150mlに溶解し、3-(N-ベンジルオキシカルボニル)アミノプロパノール4.9g、モレキュラシーブ4A10g、トリフロロメタンスルホン酸銀6.0gを加え、窒素雰囲気下-20℃で一晩攪拌した。反応液をセライトろ過した後、ろ液を飽和食塩水で2回洗浄した。ろ液に硫酸マグネシウムを加え、乾燥させた。乾燥後、硫酸マグネシウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液 トルエン:酢酸エチル=1:1)で生成物を分離し、目的物である3-(N-ベンジルオキシカルボニル)アミノプロピル-β-マルトトリオシドデカアセテート15.3gを得た。

【0022】参考例3 3-アクリロイルアミノプロピル-β-マルトトリオシドデカアセテートの合成

参考例2で得た3-(N-ベンジルオキシカルボニル)アミノプロピル-β-マルトトリオシドデカアセテート5.1gをナスフラスコにとり、メタノール70mlに溶解し、10%Pd-Cを0.3g加え、水素気流下、室温で一晩攪拌した。反応液から10%Pd-Cをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。ここに、メタノール70mlを加え、生成物を溶解し、トリエチルアミン0.76mlを加えた。さらに、塩化アクリロイル0.44mlをテトラヒドロフラン5mlに溶解したものを氷冷下攪拌しながら滴下した。このとき、pH8.5を保つように適宜トリエチルアミンを加えてpHを調整した。約2時間攪拌後、反応液を氷水中に注ぎ込み、クロロホルムで抽出した。抽出液を1N塩酸、希炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順に洗浄した。抽出液を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液 トルエン:酢酸エチル=1:1)で生成物を分離し、目的物である3-アクリロイルアミノプロピル-β-マルトトリオシドデカアセテート2.8gを得た。

【0023】参考例4 ウンデカベンジルマルトトリオシド

マルトトリオース10g、無水ジメチルホルムアミド1

00 ml を塩化カルシウム管を取り付けたフラスコにとり、 -20°C に冷却する。ここに 60% 水素化ナトリウムミネラルオイル懸濁液 17.6 g を撈拌しながら徐々に加え、水素の発生が静まるのを待ち、次いで臭化ベンジル 56.5 g を滴下した。滴下終了後、温度を室温にもどし、3 時間撈拌した。反応後、水素の発生がなくなるまでメタノールを滴下した。反応液を減圧濃縮し、残渣をクロロホルムで抽出し、水、1 N 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水の順で洗浄した後、硫酸マグネシウムで有機相を乾燥させた。乾燥後、硫酸マグネシウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液 トルエン：酢酸エチル = 2 : 1）で生成物を分離し、目的物であるウンデカベンジルマルトリオシド 24.7 g を得た。

【0024】参考例 5 デカベンジルマルトリオシルトリクロアセトイミデートの合成

参考例 4 で得たウンデカベンジルマルトリオシド 22.5 g をナスフラスコにとり、ここに酢酸 50 ml、3 M 硫酸 14 ml を加え、 80°C で 30 分間撈拌することにより、1 位のベンジル基を脱保護した。反応物を酢酸エチル 150 ml で抽出し、抽出液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水の順で洗浄した。抽出液に硫酸マグネシウムを加え、乾燥させた。乾燥後、硫酸マグネシウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液 ヘキサン：酢酸エチル = 5 : 1）で脱保護体 19.0 g を分離した。脱保護体 14.1 g をナスフラスコにとり、トリクロアセトニトリル 7.2 g、ジクロロメタン 100 ml を加えた。 0°C で撈拌しながら 1, 8-ジアザビシクロ

[5, 4, 0]-7-ウンデセン 0.75 g を加え、3 分間反応させた。反応液を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液 ヘキサン：酢酸エチル = 3 : 1）で生成物を分離し、目的物であるデカベンジルマルトリオシルトリクロアセトイミデート 9.3 g を得た。

【0025】参考例 6 3-(N-ベンジルオキシカルボニル) アミノプロピル- α -デカベンジルマルトリオシドの合成

参考例 5 で得たデカベンジルマルトリオシルトリクロアセトイミデート 6.2 g、3-(N-ベンジルオキシカルボニル) アミノプロパノール 1.0 g、ジクロロメタン 100 ml をナスフラスコにとり、さらにモレキュラシーブ 4A 2 g、トリフロロメタンスルホン酸トリメチルシリル 1.1 g を加え、窒素雰囲気下 -20°C で 2 時間撈拌した。反応液をセライトろ過した後、ろ液を飽和食塩水で 2 回洗浄した。ろ液に硫酸マグネシウムを加え、乾燥させた。乾燥後、硫酸マグネシウムをろ別し、ろ液を減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（溶出液 トルエン：酢酸エチル = 4 : 1）で生成物を分離し、目的物である 3-(N-ベンジルオキ

シカルボニル) アミノプロピル- α -デカベンジルマルトリオシド 4.5 g を得た。

【0026】実施例 1 3-アクリロイルアミノプロピル- β -マルトリオシドの合成

参考例 3 で得た 3-アクリロイルアミノプロピル- β -マルトリオシドデカアセテート 1.0 g をナスフラスコにとり、テトラヒドロフラン：メタノール = 1 : 1 の混合溶媒 20 ml に溶解させ、ナトリウムメチラート 16 mg を加え、1 時間撈拌した。反応後、 H^{+} 型にした陽イオン交換樹脂 Dowex 50WX-8（ダウケミカル製）を加え、中和した。イオン交換樹脂をろ別し、ろ液を減圧濃縮した。Sephadex LH-20（アマシャムファルマシア製）カラムクロマトグラフィー（溶出液：95% エタノール）で生成物を分離し、目的物である 3-アクリロイルアミノプロピル- β -マルトリオシド 0.59 g を得た。

【0027】実施例 2 3-アクリロイルアミノプロピル- α -マルトリオシドの合成

参考例 6 で得た 3-(N-ベンジルオキシカルボニル) アミノプロピル- α -デカベンジルマルトリオシド 3.2 g をナスフラスコにとり、メタノール 40 ml に溶解し、10% Pd-C を 0.2 g 加え、水素気流下、室温で一晩撈拌した。反応液から 10% Pd-C をろ別し、ろ液を減圧濃縮した。ここに、水 50 ml を加え、生成物を溶解し、1 N 水酸化ナトリウム水溶液 4 ml を加えた。さらに、塩化アクリロイル 0.2 ml をテトラヒドロフラン 5 ml に溶解したものを氷冷下撈拌しながら滴下した。このとき、pH 8.5 を保つように適宜 1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を調整した。約 2 時間撈拌後、1 N 塩酸で反応液を中和し、凍結乾燥した。残渣を 70% エタノールで溶解し、Sephadex LH-20（アマシャムファルマシア製）カラムクロマトグラフィー（溶出液 70% エタノール）で生成物を分離し、目的物である 3-アクリロイルアミノプロピル- α -マルトリオシド 0.69 g を得た。

【0028】実施例 3 3-アクリロイルアミノプロピル- β -マルトリオシドとアクリルアミドからなる共重合体（1 : 400）の合成

実施例 1 で得た 3-アクリロイルアミノプロピル- β -マルトリオシド 6.15 mg およびアクリルアミド 284 mg を蒸留水 25 ml に溶解し、ここに、N, N'-メチレンビスアクリルアミド 22.7 mg および N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン 5 μl を加え、溶解した。溶液を 4°C に冷やし、ここに 10% ペルオキソ二硫酸アンモニウム水溶液を 50 μl 添加し、1 時間重合させた。重合後、得られたゲルを凍結乾燥し、共重合体 310 mg を得た。共重合体はホモジナイズした後、1 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（以下、EDTA \cdot 2Na と略する）、10 mM 2-メルカプトエタノールを含む 20 mM Tris

-HCl緩衝液(pH8.0)の中で保存した。

【0029】実験例4 3-アクリロイルアミノプロピル-β-マルトトリオシドとN-イソプロピルアクリルアミドからなる共重合体(1:400)の合成

実施例3においてアクリルアミドの代わりにN-イソプロピルアクリルアミド453mgを用い、N,N'-メチレンビスアクリルアミドを用いないこと以外は同様にして重合反応を行った。重合後、得られたポリマーを凍結乾燥し、共重合体460mgを得た。得られた共重合体は実施例3と同様の方法で保存した。

【0030】実施例5 3-アクリロイルアミノプロピル-α-マルトトリオシドとアクリルアミドからなる共重合体(1:400)の合成

実施例3において3-アクリロイルアミノプロピル-β-マルトトリオシドの代わりに実施例2で得た3-アクリロイルアミノプロピル-α-マルトトリオシドを用い、同様にして共重合体310mgを得た。得られた共重合体は実施例3と同様の方法で保存した。

【0031】実施例6 チオール基を有する不溶性高分子、3-アクリロイルアミノプロピル-β-マルトトリオシド、アクリルアミドからなるグラフト共重合体の合成

活性化Thiol Sepharose 4B (アマシャムファルマシア製) 1gに1%ジチオスレイトールおよび1mM EDTA・2Naを含む0.3M炭酸水素ナトリウム溶液4mlを加え、時々穏やかに攪拌しながら40分間室温で反応させた。樹脂をろ別し、0.5M NaClおよび1mM EDTA・2Naを含む0.1M 酢酸で十分洗浄した。脱気した蒸留水でさらに洗浄

した後、樹脂1mlを取り、これに実施例1で得た3-アクリロイルアミノプロピル-β-マルトトリオシド3.1μg、アクリルアミド35μg、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン5.8μgを含む脱気した蒸留水3mlを加えた。反応液を4℃に冷やし、ここに0.1%ペルオキシ二硫酸アンモニウム水溶液を4.6μl添加し、9時間反応させた。反応液を液体窒素で20秒冷却し、反応を停止させた。樹脂をろ別し、0.1%牛血清アルブミンを含む25mM HEPES緩衝液(pH7.4)で十分洗浄した後、25mM HEPES緩衝液(pH7.4)中で保存した。

【0032】参考例7 β1,4-ガラクトース転移酵素の活性測定法

適当な濃度の酵素液40μlを19mM D-グルコース、0.37mM UDP-ガラクトース、0.14mM β-NADH、1.3mM ホスホエノールピルビン酸、17.5U ピルビン酸キナーゼ、25U 乳酸脱水素酵素、5.0mM MnCl₂、0.02% α-ラクトアルブミンを含む52mM グリシルグリシン緩衝液(pH8.4)3.025mlに加え、30℃で約10min反応させ、340nmにおける吸光度(以下、A340と示す)の減少を記録した。ブランクとして酵素液の代わりに20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.5、2mM EDTA・4Na、2mM 2-メルカプトエタノール)を用いた。テストおよびブランクの最大ΔA340/分を求め、以下の算出式に従い活性を算出した。

【0033】

【数1】

【0034】なお、
$$\frac{\text{U}}{\text{ml}} = \frac{(A340/\text{分}(\text{テスト}) - A340/\text{分}(\text{ブランク})) \times 3.065 + 8.022 \pm 0.04}{0.01 \text{ ml 植菌し、} 25^\circ\text{C、通気量} 1.5 \text{ L/分、} 6 \text{ 時間、} 300 \text{ rpm で攪拌し培養した。その後、イソプロピル-}\beta\text{-D-チオガラクトピラノシドを} 0.3 \text{ mM になるように添加し、さらに} 18 \text{ 時間培養を続けた。得られた培養液を遠心分離し、菌体を集めた。集めた菌体を} 0.1 \text{ M NaCl、} 1 \text{ mM EDTA}\cdot 2\text{Na、} 10 \text{ mM } 2\text{-メルカプトエタノールを含む} 20 \text{ mM Tris-HCl (pH7.4; 以下、カラムバッファー (pH7.4、} 0.1 \text{ M NaCl) と示す) } 150 \text{ ml で懸濁し、超音波破碎機により、菌体を破碎し、融合蛋白質を抽出した。}$$

【0035】参考例8 MBP-β1,4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質の調製

ヒト胎盤より取得したβ1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子より膜結合部位をコードする部分を取り除いた遺伝子をベクターpMAL-p2 (NEB社製)のEcoRIおよびSalIサイトに挿入し、MBP-β1,4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質発現ベクターpMG-P21を調製した。該発現ベクターpMG-P21でエシェリヒア・コリ (Escherichia coli) JM109を形質転換し、MBP-β1,4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質生産菌エシェリヒア・コリ JM109 (pMG-P21)を得た。本菌を0.2%グルコースおよびアンピシリン50mg/Lを含むLB培地50mlの入った500ml容坂口フラスコに植菌し、37℃、16時間、180rpmで振とう培養した。得られた培養液を上記培地3Lの入った5L容ジャーファメンターに3

0ml 植菌し、25℃、通気量1.5 L/分、6時間、300rpmで攪拌し培養した。その後、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを0.3mMになるように添加し、さらに18時間培養を続けた。得られた培養液を遠心分離し、菌体を集めた。集めた菌体を0.1M NaCl、1mM EDTA・2Na、10mM 2-メルカプトエタノールを含む20mM Tris-HCl (pH7.4; 以下、カラムバッファー (pH7.4、0.1M NaCl) と示す) 150mlで懸濁し、超音波破碎機により、菌体を破碎し、融合蛋白質を抽出した。

【0036】破碎液を遠心分離し、無細胞抽出液155mlを得た。無細胞抽出液のβ1,4-ガラクトース転移酵素活性は1.4U/mlであり、比活性は80mU/mg-蛋白質であった。得られた無細胞抽出液にポリエチレンジアミンを0.7%になるまで攪拌しながら徐々に加えた。このときpHが8を越えないようにHClでpHを調節した。添加後、さらに30分間攪拌を続けた。生じた沈殿を遠心分離で取り除き、上清160mlを得た。ここに、硫酸アンモニウムを75.5g (70

%飽和) 4℃で攪拌しながら徐々に加えた。添加後、さらに1時間攪拌を続けた。生じた沈殿を遠心分離にて集めた。得られた沈殿をカラムバッファー (pH8.0) で再溶解し、30mlにした。これを透析 (外液はカラムバッファー (pH8.0)) により、脱塩した。予めカラムバッファー (pH8.0) で平衡化したDEAEセファロースCL6B (アマシャムファルマシア製) を50ml充填したカラムに、脱塩した酵素液を吸着させ、同バッファー150mlで洗浄後、同バッファー250mlおよびカラムバッファー (pH8.0、0.1M NaCl) 250mlを用いたリニアグラジエントにより溶出させることにより、MBP-β1, 4-ガラクトース転移酵素融合蛋白質画分18mlとして精製した。得られた精製酵素液は活性6.2U/ml、比活性3.2U/mg-蛋白質であった。

【0037】参考例9 固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素の活性測定法

固定化1, 4-ガラクトース転移酵素を適当量とり、100nM PA化オリゴ糖 (GlcNAcβ1→2Manα1→3 (GlcNAcβ1→2Manα1→6) Manβ1→4GlcNAcβ1→4GlcNAc-P A)、200μMUDP-Gal、10mM MnCl₂、α-ラクトアルブミン 0.26mg/mlを含む25mM HEPES緩衝液 (pH7.5) 100μl中、20℃で1時間振とう攪拌しながら反応させた。反応後、生成物をHPLCにより定量した。参考例7の活性測定法で予め活性を測定した酵素液を用いて、上記活性測定反応を行い、生成物量からガラクトース転移量を求め、検量線を作成し、その検量線より活性を算出した。

【0038】実施例7 β1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化 (その1)

実施例3で合成した共重合体50μlをとり、これに参考例8で得た精製酵素液50μlおよびカラムバッファー (pH8.0) 200μlを加え、4℃で穏やかに2時間振とうした。遠心分離し、上清を取り除き、カラムバッファー (pH8.0) 200μlでゲルを2回洗浄することにより、固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素を得た。洗浄液を上清と併せ、回収液とした。回収液および固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素の酵素活性を測定し、活性回収率を算出した。固定化酵素の活性は550mU/ml-レジンであり、活性回収率は23%であった。

【0039】実施例8 β1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化 (その2)

実施例4で得た共重合体を0.2g/mlになるようにカラムバッファー (pH8.0) に溶解したものを250μlとり、これに参考例8で得た精製酵素液50μlを加え、4℃で2時間放置した。放置後、35℃に加温し、析出してくる固定化β1, 4-ガラクトース転移酵

素を遠心分離により集めた。集めた固定化酵素を200μlのカラムバッファー (pH8.0) に4℃で溶解し、35℃に加温し、遠心分離により再度集めた。この操作をもう一度繰り返した。遠心分離したときの上清を集め、回収液とした。得られた固定化酵素と回収液のβ1, 4-ガラクトース転移酵素活性を測定し、活性回収率を算出した。固定化酵素の活性は720mU/g-レジンであった。活性回収率は35%であった。

【0040】実施例9 β1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化 (その3)

参考例8で得た精製酵素液50μlおよびカラムバッファー (pH8.0) 200μlの代わりに参考例8で得た無細胞抽出液250μlを用いる以外は実施例7と同様にして固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は460mU/ml-レジンであり、活性回収率は20%であった。

【0041】実施例10 β1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化 (その4)

実施例3で得た共重合体の代わりに実施例5で得た共重合体を用いて、実施例7と同様にして、固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は605mU/ml-レジンであり、活性回収率は25%であった。

【0042】実施例11 β1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化 (その5)

実施例3で得た共重合体の代わりに実施例6で得たグラフト共重合体を用いて、実施例7と同様にして、固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。得られた固定化酵素の活性は434mU/ml-レジンであり、活性回収率は18%であった。

【0043】比較例1 アミロースレジン (NEB社製) へのβ1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化 (その1)

実施例3で得た共重合体の代わりにアミロースレジンを用いる以外は実施例9と同様にして、固定化β1, 4-ガラクトース転移酵素を調製した。しかし、固定化酵素としての活性は認められなかった。活性は全て回収液として回収されており、アミロースレジンには酵素は結合していなかった。

【0044】実施例12 β1, 4-ガラクトース転移酵素の固定化 (その6)

参考例8で得た精製酵素液50μlにカラムバッファー (pH8.0) を1ml加え、さらに実施例1で得た3-アクリロイルアミノプロピル-β-マルトトリオシドを615mg/L含む水溶液10μlを加え、4℃で1時間放置し、複合体を形成させた。ここに、アクリルアミドを28.4mg/ml、N, N'-メチレンビスアクリルアミドを2.27mg/ml含む水溶液10μlを加え、さらに0.1%N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン水溶液5μlおよび0.1%ペル

オキシ二硫酸アンモニウム水溶液 $5\mu\text{l}$ を加え、1時間重合させた。得られた固定化酵素をホモジナイズし、実施例7と同様にして洗浄した。固定化酵素の活性は $980\text{mU}/\text{ml}$ - レジンであり、活性回収率は16%であった。

【0045】比較例2 アミロースレジン（NEB社製）への $\beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素の固定化（その2）

実施例3で得た共重合体の代わりにアミロースレジンを用いる以外は実施例7と同様にして固定化 $\beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素を調製した。固定化酵素の活性は $830\text{mU}/\text{ml}$ - レジンであり、活性回収率は25%であった。

【0046】実施例13 固定化 $\beta 1, 4$ -ガラクトー

ス転移酵素からの酵素の脱離

実施例7および比較例2で得た固定化酵素をそれぞれ $10\mu\text{l}$ とり、種々の濃度のマルトースを含むカラムバッファー（ $\text{pH} 8.0$ ） $100\mu\text{l}$ に浸漬した。4℃で1時間放置した後、遠心分離して得られる上清中の $\beta 1, 4$ -ガラクトース転移酵素活性を測定した。比較例2で得た固定化酵素はマルトース濃度 1mM で酵素が脱離してきたが、実施例7で得た固定化酵素は脱離しなかった。

【0047】

【発明の効果】 上述したように、本発明のマルトオリゴ糖を側鎖に有するアクリルアミド誘導体を利用することにより、固定化酵素を効率よく、しかも容易に調製することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
C 0 8 F 220/06		C 0 8 F 220/06	
220/10		220/10	
220/54		220/54	
290/02		290/02	
291/00		291/00	
C 1 2 N 9/10		C 1 2 N 9/10	
11/08		11/08	C
(72) 発明者 西村 紳一郎		(72) 発明者 中尾 綾子	
北海道札幌市中央区北九条西十六丁目1-1-302		北海道札幌市北区北十七条西三丁目21-505	
		(72) 発明者 山田 久里子	
		北海道札幌市北区麻生町七丁目1-1-311	